

 **Include**

MicroPatent® PatSearch FullText: Record 1 of 1

Search scope: US Granted US Applications EP-A EP-B WO JP ; Full patent spec.

Years: 1971-2002

Text: Patent/Publication No.: JP06074956

[no drawing available]

[Go to first matching text](#)

JP06074956 A
REAGENT FOR ANTIBODY MEASUREMENT
DAINABOTSUTO KK

Inventor(s): TAKEI TOSHINORI ;INOUE YUZO ;ASAHIKA AKI ;TOKITA SUSUMU

Application No. 04270684 JP04270684 JP, Filed 19920828, A1 Published 19940318

Abstract: PURPOSE: To enable an antibody to be measured highly sensitively and accurately with freedom from an influence by the storage state of a reagent or the like, regarding a measurement system for an antibody in a specimen with an immunological method based upon a reagent to use antigen having a sensitive thiol group or peptide having action substantially equivalent thereto.

CONSTITUTION: Regarding an antigen having a sensitive thiol group or a reagent containing peptide having action substantially equivalent thereto for immunologically measuring an antibody in a specimen, the reagent is made to contain a reducing agent, or the antigen having a solid phase of the sensitive thiol group or the reagent containing peptide having action substantially equivalent thereto is treated with the reducing agent. The antibody can thereby be measured highly sensitively and accurately without an influence by the storage state of the reagent or the like. As a result, the sensitivity of the reagent can be enhanced at the time of immunologically measuring the antibody in the specimen.

Int'l Class: G01N033576; G01N03353 G01N033569

Patents Citing This One (1):

- US6306579B1 20011023 Roche Diagnostics GmbH
Recombinant antigen from the NS3 region of the hepatitis C virus

[Home](#)[List](#)

For further information, please contact:
[Technical Support](#) | [Billing](#) | [Sales](#) | [General Information](#)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-74956

(43) 公開日 平成6年(1994)3月18日

(51) Int.Cl.⁵

識別記号

序内整理番号

F I

技術表示箇所

G 01 N 33/576

Z 9015-2 J

33/53

D 8310-2 J

33/569

L 9015-2 J

審査請求 未請求 請求項の数10(全 8 頁)

(21) 出願番号

特願平4-270684

(71) 出願人 000109015

ダイナボット株式会社

東京都港区虎ノ門3-8-21 第33森ビル

(72) 発明者

武井 俊憲

千葉県松戸市稔台344 ダイナボット株式会社総合研究所内

(72) 発明者

井上 裕三

千葉県松戸市稔台344 ダイナボット株式会社総合研究所内

(72) 発明者

朝比奈 亜紀

千葉県松戸市稔台344 ダイナボット株式会社総合研究所内

(74) 代理人

弁理士 齊藤 武彦 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体測定用試薬

(57) 【要約】

【目的】 感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを用いる試薬による免疫学的方法による検体中の抗体測定系で、抗体を試薬の貯蔵状態などに影響されること無く高い感度で測定すると共により正確に測定する。

【構成】 検体中の抗体を免疫学的方法により測定するための感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、該試薬に還元剤を含有せしめるか、固相化された該感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬を還元剤で処理することにより抗体を試薬の貯蔵状態などに影響されること無く高い感度で測定すると共により正確に測定できる。

【効果】 検体中の抗体を免疫学的方法により測定するにさいし、その試薬の感度を高めることが出来る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体中の抗体を免疫学的方法により測定するための感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、該試薬に還元剤を含有せしめるか、固相化された該感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬を還元剤で処理することを特徴とする抗体測定用試薬。

【請求項 2】 該抗原がHCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドである請求項1記載の抗体測定用試薬。

【請求項 3】 還元剤が反応用溶媒中に存在する請求項1記載の抗体測定用試薬。

【請求項 4】 該試薬が、HCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを担体に固相化した抗原であり、該試薬が還元剤で処理されている請求項1記載の抗体測定用試薬。

【請求項 5】 該抗原がHCVゲノム上の非構造領域のNS3領域である請求項2または4記載の抗体測定用試薬。

【請求項 6】 該抗原が遺伝子組換え技術による発現産物である請求項5記載の抗体測定用試薬。

【請求項 7】 該抗原が合成ペプチドである請求項5記載の抗体測定用試薬。

【請求項 8】 該試薬が、担体を含み、該担体がビーズ、チューブ、プレート、赤血球、またはラテックス粒子である請求項1記載の抗体測定用試薬。

【請求項 9】 還元剤がチオール基の酸化防止剤である請求項1～8記載の抗体測定用試薬。

【請求項 10】 還元剤がジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、チオグリコール酸、システイン、グルタチオン、2-メルカブトエタノール、2-メルカブトエチルアミンおよびこれらの混合物から成る群より選ばれた少なくとも一つである請求項1～8記載の抗体測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗体を測定するための試薬、特に免疫学的方法により検体中の抗体を感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを用いて測定するための試薬において、抗体を試薬の貯蔵状態などに影響されること無く高い感度で測定すると共により正確に測定するための測定用試薬に関する。特に、本発明はC型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体を測定するための試薬、特に免疫学的方法により検体中のHCV抗体を高い感度で測定すると共により正確に測定するための測定用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】 C型肝炎ウイルス(HCV)による感染を診断する方法としては、1988年に米国カイロン社

よりHCVゲノム上の非構造領域であるNS3およびNS4領域にコードされるC100-3抗原を使用したHCV抗体測定系が開発された。1991年には、HCVゲノム上の構造領域であるコア領域およびC100-3抗原とは重複しないNS3領域にコードされるコア抗原および33C抗原の使用により更に感度および検出率の優れたHCV抗体測定系が開発された。これらHCV抗体の測定法としては、赤血球やラテックス粒子を抗原担持担体として用いる凝集法、ビーズ、チューブ、あるいはプレートを抗原固相化担体として用いるイムノメトリック法等が用いられている。しかし、抗原を担体上へ固相化する工程中あるいは調製された試薬の保存中に抗原の活性が反応溶液中で急激に低下し、抗原抗体反応が十分に進行できないために測定感度が十分に上がらない、更には抗原の活性が経時的に変化するために感度の再現性が悪化する等の問題があった。このようにある種の抗原を用いた試薬の場合、試薬の保存中に抗原の活性が反応溶液中で急激に低下し、抗原抗体反応が十分に進行できず測定感度が十分に上がらないとか、抗原の活性が経時的に変化するために感度の再現性が悪化する等の問題があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者等は、従来のHCV抗体測定系における感度の問題を解決すべく鋭意研究した結果、この感度不良の問題は、HCV抗原、特にHCVゲノム上のNS3領域にコードされているタンパク質に含まれているシステインが自然酸化を受け、ジスルフィド結合等になることに起因することを解明した。本発明者等は、これらの知見に基づきHCV測定系に還元剤、特にチオール保護剤を添加することにより、そのHCV抗体測定系の感度の低下の問題を防止でき、さらにその還元剤処理は該測定系に悪影響を与えないものであることを知った。本発明者等は、この知見から感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを用いる試薬による免疫学的方法による検体中の抗体測定系にも還元剤、特にチオール保護剤を添加したりすることにより感度の低下を防止できるだけでなく、該測定系に悪影響を与えないようにならうとの応用ができると考え、本発明を完成したものである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は検体中の抗体を免疫学的方法により測定するための感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、還元剤を含有せしめること、あるいは担体に固相化した抗原を還元剤で処理することを特徴とし、測定系の感度を高めたり、測定結果の信頼性を高めるにある。特に本発明は検体中のHCV抗体を免疫学的方法により測定するための試薬において、該HCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、還元剤を含有せしめること、あるいは担体に固相化した抗原を還元剤で処理することを特徴とし、測定系の感度を高めたり、測定結果の信頼性を高めるにある。特に本発明は検体中のHCV抗体を免疫学的方法により測定するための試薬において、該HCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチド含有試薬において、還元剤を含有せしめること、あるいは担体に固相化した抗原を還元剤で処理することを特徴とし、測定系の感度を高めたり、測定結果の信頼性を高めるにある。

チド含有試薬に還元剤を含有せしめること、あるいは担体に固相化したHCV抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを還元剤で処理することを特徴とし、測定系の感度を高めたり、測定結果の信頼性を高めるにある。本発明において用いられる検体としては、問題の抗体を含有する生体由来成分であればよく、例えば、血液、血清、精液、脊髄液、リンパ液、痰、涙、唾液、乳汁、白血球、消化器官粘液、尿等の体液あるいは組織液等が挙げられ、更にインビトロの細胞培養液等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0005】本発明は、赤血球やラテックス粒子等の微粒子担体に感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを感作した感作担体を用いて、凝集反応により検体中の特異抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬を製造するに際し、担体にその抗原を感作した後、得られた感作担体を還元剤を含有する緩衝液に分散させ、上記感作担体含有緩衝液を凍結乾燥することにより達成することができる。特に本発明は、赤血球やラテックス粒子等の微粒子担体にHCV抗原を感作した感作担体を用いて、凝集反応により検体中のHCV抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬を製造するに際し、担体にHCV抗原を感作した後、得られた感作担体を還元剤を含有する緩衝液に分散させ、上記感作担体を含有する緩衝液を凍結乾燥することとなる。ここで用いることが出来る還元剤としては、チオール保護剤として知られたものが挙げられる。また、還元剤としては、チオール基の酸化防止剤であるものが好ましく、例えばジチオスレイトール、ジチオエリスリトール、テオグリコール酸、システイン、グルタチオン、2-メルカブトエタノール、2-メルカブトエチルアミンおよびこれらの混合物から成る群より選ばれた少なくとも一つであるものが挙げられる。特に、ジチオスレイトール、グルタチオン、2-メルカブトエタノール等が好ましい。

【0006】ここで用いることが出来る微粒子担体としては、微粒子用担体として広く知られたものが挙げられ、例えば合成樹脂、ニトロセルロース等の天然あるいは合成の高分子等から作られたものの他、ラテックス粒子等あるいは赤血球等が挙げられる。本発明に従えば、凝集反応時に感作担体を懸濁させる際の使用緩衝液中に上記還元剤を添加してもよい。また、本発明は、感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを不溶性担体に固相化することによって得られた固相化抗原を用いて、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、あるいはフルオロイムノアッセイ (FIA) 等の方法により検体中の特異抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬を製造するに際し、不溶性担体に感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドを固相化した後、得られた抗原結合固相を前記

の還元剤あるいはこれらの混合物を含有する緩衝液に浸漬した後、上記固相を乾燥することにより達成することが出来る。特に、本発明では、HCV抗原を不溶性担体に固相化することによって得られた固相化抗原を用いて、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、あるいはフルオロイムノアッセイ (FIA) 等の方法により検体中のHCV抗体を免疫学的に測定するために使用する試薬を製造するに際し、不溶性担体にHCV抗原を固相化した後、得られた抗原結合固相を前記の還元剤あるいはこれらの混合物を含有する緩衝液に浸漬した後、上記固相を乾燥することにより達成することが出来る。

【0007】ここで用いることが出来る還元剤としては、上記と同様なチオール保護剤として知られたものが挙げられる。本発明に従えば、抗原結合固相に検体中の特異抗体を反応させる際に使用する反応液中に上記の還元剤あるいはこれらの混合物を添加してもよい。ここで用いることが出来る不溶性担体としては、固相化用担体として広く知られたものが挙げられ、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリアクリレート等の合成樹脂、ニトロセルロース、重合アミノ酸、多糖等の天然あるいは合成の高分子、ガラス等から作られた、粒子、膜、ビーズ、チューブ、あるいはプレート等の形状のものがある。また、固相化にあたっては、物理的吸着法あるいは化学的に結合剤を用いて固相化せしめる方法がある。化学的な結合剤としては、通常の当業者に知られたものの中から選択することができるが、例えば、6-マレイミドカブロン酸、2-ブロモ酢酸、2-ヨード酢酸、コハク酸等の活性エステル、トリアシンの活性エステル、スルホン酸エステル誘導体等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0008】本発明で用いる抗原としては、感受性チオール基を持つ抗原またはそれと実質的に同等の作用を有するペプチドが挙げられる。ここで感受性チオール基とはタンパク質またはペプチドに含まれているシステイン中のチオール基であって、通常のもとで自然酸化または人工的酸化に感受性で、該抗原の活性に大きく影響を与える基をいう。ここで抗原の活性とは、特異的な抗原抗体反応をなすことができるものをいい、特に検体中の特異抗体と免疫学的方法で反応する特異抗原の活性を指す。本発明で用いる抗原は、このように感受性チオール基を持つものであれば、遺伝子工学的手法によって作製された発現産物たる組換え抗原、あるいは合成ペプチドであるものも格別の制限無く用いることが出来る。本発明においては、たとえ分子中にシステインのチオール基またはそれに由来するジスルフィド結合を有していてもそれらが該抗原の活性に影響を与える基でない場合は、本発明で還元剤による処理をなす抗原としてはそれを意図しない。特に本発明で用いるHCV抗原は、遺伝子工学的手法によって作製された発現産物たる組換えH

5

HCV抗原、あるいは合成ペプチドであるHCV抗原ペプチドが挙げられる。本発明で用いるHCV抗原として、好みいものとしてはHCVゲノム上の非構造領域のN S 3領域に相当するものが挙げられる。

【0009】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。

実施例1 DTT添加による感作血球への影響

ヒト固定化赤血球をリン酸緩衝液(pH 7.4)で3回洗浄後、pH 5.7の酢酸緩衝液に1容量%となるよう懸濁し、遺伝子組換え技術により產生された精製HCV抗原(コア抗原、33C抗原およびC100抗原の混合物)を最終濃度が6 μ g/mlとなるように添加し、温室で1時間攪拌した後に、リン酸緩衝液(pH 7.4)で3回洗浄し、7.5%のサツカロースを含有*

6

*するリン酸緩衝液(pH 7.4)中で凍結乾燥して、HCV抗原感作赤血球を調製した。得られたHCV抗原感作赤血球を2 mMのジチオスレイトール(DTT)を含むトリス塩酸緩衝液(pH 7.8)及び対照としてDTTを含まないトリス塩酸緩衝液に、1容量%となるよう再懸濁を行い、感度を比較した。感度の比較は、HCV抗体陽性ヒト血清を同抗体が陰性である血清により予め段階希釈したものを感じ度管理用血清として使用した。マイクロタイタープレートの各ウエルに、リン酸緩衝液(pH 7.4)25 μ l、及び各濃度の感度管理用血清25 μ lを分注し、さらに感作血球を25 μ l分注して、ミキサーで30秒間攪拌し、室温で1時間放置後、結果を目視により判定した。

【表1】

感作血球懸濁液		
	DDT存在	DDT非存在
感度管理用 血清の希釈率		
血清A		
× 1	+	+
× 2	+	+
× 4	+	+
× 8	+	-
× 16	-	-
× 32	-	-
× 64	-	-
血清B		
× 1	+	++
× 2	++	++
× 4	++	-
× 8	+	-
× 16	-	-
× 32	-	-
× 64	-	-

(+ : 陽性、- : 陰性)

表1の結果より、DTTを含有する緩衝液に感作血球を再懸濁した場合には感度が上昇していることが示された。

【0010】

実施例2 2-ME添加による感作血球への影響

実施例1と同様に調製した感作血球を40 mMの2-MEルカブトエタノール(2-ME)を含有するトリス塩酸

緩衝液(pH 7.8)に1容量%となるよう再懸濁し、懸濁後の保存安定性について2-MEを含まないトリス塩酸緩衝液を対照にして比較した。溶解後の保存は2~8°C保存とし、感作血球の感度比較は実施例1に準じて行った。

【表2】

2~8°C における 保存期間 (日)	感作血球懸濁液					
	2-ME存在			2-ME非存在		
	0	7	14	0	7	14
感度管理用 血清の希釈率						
血清A						
× 1	+	+	+	+	+	+
× 2	+	+	+	++	++	+
× 4	+	+	+	++	-	-
× 8	+	+	+	+	-	-
× 16	-	-	-	-	-	-
× 32	-	-	-	-	-	-
× 64	-	-	-	-	-	-
血清B						
× 1	+	+	+	+	+	+
× 2	+	+	+	++	++	+
× 4	+	+	+	++	-	-
× 8	+	+	+	+	-	-
× 16	-	-	-	-	-	-
× 32	-	-	-	-	-	-
× 64	-	-	-	-	-	-

(+:陽性、-:陰性)

表2の結果より、2-MEの添加により、感作血球の懸濁後の保存安定性が改善されたことが確認された。

【0011】

実施例3 グルタチオン添加による感作血球への影響

実施例1に準じてHCV抗原を感作させた血球を、7.

5%サツカロース含有リン酸緩衝液(pH 7.4)に

最終濃度が40mMとなるようにグルタチオン(GS

H)を添加した凍結乾燥用の緩衝液中で凍結乾燥し、感

作血球とした。対照としてGHSを含まない緩衝液中で凍結乾燥し、対照感作血球とした。感作血球及び対照感作血球をトリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に1容量%となるように懸濁し、室温における懸濁後の安定性について、感作血球の感度により比較した。感度比較は実施例1に準じて行った。

【表3】

凍結乾燥用緩衝液

室温での 保存期間 (日)	GSH存在			GSH非存在		
	0	1	2	0	1	2
感度管理用 血清の希釈率						
血清A						
× 1	+	+	+	+	+	+
× 2	++	++	++	++	++	-
× 4	++	++	++	++	-	-
× 8	+	+	+	+	-	-
× 16	-	-	-	-	-	-
× 32	-	-	-	-	-	-
× 64	-	-	-	-	-	-
血清B						
× 1	+	+	+	+	+	-
× 2	++	++	++	++	++	-
× 4	++	++	++	++	-	-
× 8	+	+	+	+	-	-
× 16	-	-	-	-	-	-
× 32	-	-	-	-	-	-
× 64	-	-	-	-	-	-

(+ : 陽性、 - : 陰性)

表3の結果より、GSHを添加して凍結乾燥を行った感作血球は、懸濁後の安定性が良いことが確認された。

【0012】

実施例4 2-ME添加による固相化抗原への影響

1/4インチのポリスチレンビーズを7.5%のサツカロースを含有するリン酸緩衝液(pH 7.4)中に入れ、実施例1で使用したHCV抗原を最終濃度が10μl/m1となるように添加し、37℃で1時間静置した後、リン酸緩衝液(pH 7.4)で3回洗浄し、さらに7.5%のサツカロースを含有するリン酸緩衝液(pH 7.4)中に浸漬した後、乾燥し、HCV抗原固相化ビーズを得た。上記HCV抗原固相化ビーズ1個を、反応用緩衝液として20mMの2-MEを含有するトリ

ス塩酸緩衝液(pH 7.8)200μlを入れたワイドウエルのトレイにいれ、室温で1時間放置後、感度管理用血清10μlを添加し、37℃で1時間反応させた。反応終了後、生理食塩水で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトイムノグロブリンG抗体200μlを添加し、37℃で30分反応させた。反応終了後に生理食塩水で3回洗浄し、オルトエチレンジアミン及び過酸化水素を含む基質溶液を1m1加え、室温で30分反応後に490nmの吸光度を測定することにより判定した。比較対照のために、2-MEを含有しないトリス塩酸緩衝液を反応用緩衝液として用いて同様の操作を行い、判定した。

【表4】

測定用緩衝液

	2-ME存在		2-ME非存在	
	吸光度	判定	吸光度	判定
感度管理用 血清の希釈率				
血清A				
× 1	1. 82	+	0. 69	+
× 2	1. 44	+	0. 45	-
× 4	0. 96	+	0. 32	-
× 8	0. 56	+	0. 26	-
血清B				
× 1	1. 29	+	1. 31	+
× 2	0. 93	+	0. 73	+
× 4	0. 59	+	0. 47	-
× 8	0. 38	-	0. 30	-
× 16	0. 25	-	0. 26	-

(+:陽性、-:陰性)

表4の結果より、2-MEを反応用緩衝液に添加することにより、感度の上昇が見られた。

【0013】実施例5 2-MEの添加による影響

実施例1に準じて調製したHCV抗原感作血球をトリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に懸濁し、2~8°Cで2週間放置後、HCV抗体陽性検体として抗コア(HCVのコ*

*ア領域)、抗33C(HCVのNS3領域)及び抗C100(HCVのNS3~NS4領域)のそれぞれの抗体を主に含む検体3種に対する感作血球の感度を測定し、実施例1に準じて検討した。懸濁液に40mMの2-MEを添加し、同様に感度を検討した。

【表5】

	懸濁液に2-MEを 添加した感作血球	懸濁液に2-MEを 添加しない感作血球
検体の希釈率		
抗33C抗体		
× 1 2 8	+	+
× 2 5 6	+	+
× 5 1 2	+	-
× 1 0 2 4	+	-
× 2 0 4 8	+	-
× 4 0 9 6	+	-
× 8 1 9 2	-	-

(+:陽性、-:陰性)

その結果より、2週間の放置により感度の低下した感作血球の感度が、HCVゲノム上のNS3領域にコードされる33C抗原では、2-MEの添加により回復しているのが認められた。

【0014】

【発明の効果】感受性チオール基を持つ抗原またはそれ

と実質的に同等の作用を有するペプチド含有抗体測定用試薬に還元剤を含有せしめるか、固相化された該試薬を還元剤で処理して、検体中の抗体を免疫学的方法により測定するにさいし、その試薬の感度を高めることが出来る。

フロントページの続き

(72)発明者 時田 進
千葉県松戸市総台344 ダイナボット株式
会社総合研究所内

Kokai No. 74956/1994

Kokai Date: March 18, 1994

Title of the Invention: Reagent for measuring antibody

Application No. 270684/1992

Application Date: August 28, 1992

Applicant: Dinabotto K.K.

Abstract

(Purpose) In a system for measuring an antibody in a specimen by an immunological method which uses a reagent of an antigen having a sensitive thiol group or of a peptide having substantially the same function as the antigen, enabling high sensitivity measurement and high precision measurement without influence of storage condition of the peptide reagent.

(Constitution) In a reagent containing an antigen having a sensitive thiol group for immunologically measuring an antibody in a specimen or a peptide having substantially the same function as the antigen, high sensitivity and high precision measurement without influence of storage condition of the peptide reagent is enabled by adding a reducing agent to the reagent or by treating the reagent containing an antigen having a sensitive thiol group which is immobilized to a solid phase or a peptide having substantially the same function as the antigen with a reducing agent.

(Effect) For immunologically measuring an antibody in a specimen, the sensitivity of the reagent can be enhanced.

Scope of Claim for Patent

1. A reagent for measuring an antibody containing an antigen having a sensitive thiol group for immunologically measuring an antibody in a specimen or a peptide having substantially the same function as the antigen, characterized in that a reducing agent is incorporated to the reagent or the reagent containing an antigen having the sensitive thiol group which is immobilized to a solid phase or a peptide having substantially the same function as the antigen is treated with a reducing agent.
2. The reagent for measuring an antibody according to claim 1, wherein the antigen is an HCV antigen or a peptide having substantially the same function as the antigen.
3. The reagent for measuring an antibody according to claim 1, wherein the reducing agent is present in a solvent for the reaction.
4. The reagent for measuring an antibody according to claim 1, wherein the reagent is an HCV antigen or a peptide having substantially the same function as the antigen which is immobilized to a carrier, and is treated with a reducing agent.
5. The reagent for measuring an antibody according to claim 2 or 4, wherein the antigen is the NS3 region of the non-structural region of an HCV genome.
6. The reagent for measuring an antibody according to claim 5, wherein the antigen is an expression product obtained by a genetic recombinant technology.

7. The reagent for measuring an antibody according to claim 5, wherein the antigen is a synthetic peptide.
8. The reagent for measuring an antibody according to claim 1, wherein the reagent contains a carrier which is a bead, tube, plate, red blood cell or latex particle.
9. The reagent for measuring an antibody according to claims 1 to 8, wherein the reducing agent is an antioxidant for the thiol group.
10. The reagent for measuring an antibody according to claims 1 to 8, wherein the reducing agent is at least one selected from the group consisting of dithiothreitol, dithioerythritol, thioglycollic acid, cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol, 2-mercaptoethylamine and their mixtures.

**Detailed Description of the Invention
(Field of Application in Industry)**

The present invention relates to a reagent for measuring an antibody, particularly to a reagent for measuring an antibody containing an antigen having a sensitive thiol group for immunologically measuring an antibody in a specimen or a peptide having substantially the same function as the antigen, which enables high sensitivity measurement and high precision measurement of an antibody without being influenced by storage condition of the peptide reagent. Specifically, the present invention relates to a reagent for measuring an antibody against hepatitis C virus (HCV), particularly to a reagent for immunologically measuring an anti-HCV antibody in a specimen with a high sensitivity and higher accuracy.

(Prior Art)

As a means for diagnosing infection of hepatitis C virus (HCV), an anti-HCV antibody assay system which used C100-3 antigen encoded by NS3 and NS4 regions of non-structural region of HCV genome was developed by Chiron Corp. of the United States in 1988. In 1991, an anti-HCV antibody assay system which was improved in the sensitivity and detection rate was developed by using a core antigen and 33C antigen encoded by the core region of the structural region on HCV genome and the NS3 region not overlapping with the C100-3 antigen. As the assay method for such anti-HCV antibodies, the coagulation method utilizing red blood cell or latex particles as a carrier for immobilizing antigen, the immunometric method utilizing a bead, tube, or plate as a carrier for immobilizing antigen or the like are applied. However, these methods involve some problems that sensitivity of measurement can not be achieved sufficiently as the activity of antibody in a reaction solution rapidly decreases during the process of immobilizing the antigen to the carrier or the storage of the prepared reagent, which results in insufficient antigen-antibody reaction, and also that the reproducibility of the sensitivity deteriorates as the activity of the antigen changes with the lapse of time. As described above, in cases of reagents which use some kinds of antigens, there were problems that sufficient sensitivity of measurement can not be achieved as the activity of antibody in a reaction solution rapidly decreases during the storage of the prepared reagent, which results in insufficient antigen-antibody reaction, and also that the reproducibility of the sensitivity deteriorates as the activity of the antigen changes with the lapse of time.

(Problem to be solved by the invention)

The present inventors made intensive studies with a view to solving the problem of the sensitivity of the conventional HCV antibody assay system, and as a result, they elucidated that the problem of poor sensitivity was caused by disulfide bond formation which occurs due to the fact that cysteine contained in an HCV antigen, particularly in a protein encoded by NS3 region on an HCV genome is automatically oxidized. Based on this finding, the present inventors found that addition of a reducing agent, particularly a thiol protecting agent to the HCV assay system prevents the decrease in the sensitivity of the HCV antibody assay system, and such treatment with a reducing agent does not cause any harmful influence on the system. From this finding, the present inventors considered that a reducing agent, particularly a thiol protecting reagent can be also added to an antibody assay system in a specimen by an immunological method utilizing a reagent of an antigen having sensitive thiol or peptide having substantially the same action as the antigen to prevent decrease in the sensitivity without any harmful influence, and they accomplished the present invention.

(Means for solving the problem)

The present invention relates to a reagent for measuring an antibody containing an antigen having a sensitive thiol group for immunologically measuring an antibody in a specimen or a peptide having substantially the same function, which is characterized in that a reducing agent is incorporated to the reagent or the reagent containing an antigen having a sensitive thiol group which is immobilized to a solid phase is treated with a reducing agent so as to improve the sensitivity and/or

increase reliability of the measurement. In particular, the present invention relates to a reagent for immunologically measuring an anti-HCV antibody in a specimen, which is characterized in that a reducing agent is incorporated to the reagent containing an HCV antigen or a peptide having substantially the same function as the antigen or treating the HCV antigen or a peptide having substantially the same function which is immobilized to a carrier, with a reducing agent so as to improve the sensitivity and/or increase reliability of the measurement. As a specimen which can be used in the present invention, any specimen from living body containing the antibody of interest may be used, and a body fluid or tissue fluid such as blood, serum, sperm, spinal fluid, lymph, phlegm, tear, sputum, milk, leukocyte, mucus from digestive organs, urine and the like can be exemplified. Further, in vitro cell culture liquids, etc. are also included. However, the specimen is not limited thereto.

In the preparation of a reagent for immunologically measuring a specific antibody in a specimen by coagulation reaction using a sensitized carrier in which microparticle carrier, such as red blood cell or latex particle is sensitized with an antigen having a sensitive thiol group or a peptide having substantially the same function, the present invention is achieved by sensitizing the carrier with the antigen, dispersing the thus sensitized carrier in a buffer solution containing a reducing agent, and lyophilizing the buffer solution containing the sensitized carrier. In particular, the present invention comprises the steps of sensitizing a carrier with the HCV antigen, dispersing the thus sensitized carrier in a buffer solution containing a reducing agent, and lyophilizing the buffer

solution containing the sensitized carrier in the preparation of a reagent for immunologically measuring an anti-HCV antibody in a specimen by coagulation reaction using a sensitized carrier in which microparticle carrier, such as red blood cell or latex particle is sensitized with an HCV antigen. A reducing agent which can be used may be a reagent known as a thiol protecting agent. Such a reducing agent is preferably an antioxidant for a thiol group, such as at least one selected from the group consisting of dithiothreitol, dithioerythritol, thioglycollic acid, cysteine, glutathione, 2-mercaptoethanol, 2-mercaptoethylamine and their mixtures. Dithiothreitol, glutathione, and 2-mercaptoethanol are particularly preferred.

As a microparticle carrier, any carriers widely known as a microparticle carrier, such as those made from natural or synthetic polymers like synthetic resins or nitrocellulose, as well as latex particle or red blood cell can be used. According to the present invention, the above reducing agent may be added to the buffer solution used during suspending the sensitized carrier for coagulation reaction. In addition, the present invention may be achieved, in preparing a reagent for immunologically measuring a specific antibody in a specimen by using an immobilized antigen obtained by immobilizing an antigen having a sensitive thiol group or a peptide having substantially the same function to an insoluble carrier, for enzyme immunoassay (EIA), radio immunoassay (RIA), or fluorescence immunoassay (FIA), by immobilizing an antigen having a sensitive thiol group or a peptide having substantially the same function to an insoluble carrier, then dipping a solid phase carrying the immobilized antigen

in a buffer solution containing the reducing agent or a mixture thereof, and subsequently drying the solid phase. In particular, the present invention may be achieved, in preparing a reagent for immunologically measuring an anti-HCV antibody in a specimen by using an immobilized antigen obtained by immobilizing an HCV antigen to an insoluble carrier, for enzyme immunoassay (EIA), radio immunoassay (RIA), or fluorescence immunoassay (FIA), by immobilizing an HCV antigen to an insoluble carrier, then dipping a solid phase carrying the immobilized antigen in a buffer solution containing the above-described reducing agent or a mixture thereof, and subsequently drying the solid phase.

As the reducing agent to be used here, there may be mentioned those known as a thiol protecting agent like those described above. According to the present invention, the above reducing agent or mixture thereof may be added to a reaction solution used during the reaction of a solid phase carrying the immobilized antigen with the specific antibody in a specimen. As an insoluble carrier which can be used for this purpose, any solid phase carrier widely known can be exemplified such as those in the form of particle, membrane, bead, tube and plate made from natural or synthetic polymers such as nitrocellulose, polymeric amino acids, polysaccharides, or glass. For immobilization to a solid phase, there may be mentioned a physical adsorption method, chemical binding method in which a binder is employed, and the like. Chemical binders can be selected from those known to a person skilled in the art, such as activated esters of 6-maleimidocaprylic acid, 2-bromoacetic acid, 2-iodoacetic acid and succinic acid, activated esters of triazine, ester derivatives of sulfonic acid and the like, but they are not limited to these.

As an antigen used in the present invention, it can be exemplified as an antigen having a sensitive thiol group or a peptide having substantially the same function as the antigen. Here, the sensitive thiol group means the one in cysteine contained in proteins or peptides, which thiol group is sensitive to natural or artificial oxidization under usual condition and greatly influences on the activity of the antigen. The activity of the antigen means the ability of performing a specific antigen-antibody reaction, in particular the activity of a specific antigen which reacts immunologically with a specific antigen in a specimen. The antigen used in the present invention may be any one, without particular restriction, including a recombinant antigen as an expression product of a genetic engineering method or any of synthetic peptide, as long as it has a sensitive thiol group. In the present invention, the antigen to be treated with a reducing agent is not intended to be included in the antigens having a thiol group of cysteine or disulfide bond derived therefrom which have no influence on the activity of the antigen. In particular, the HCV antigen used in the present invention may be a recombinant HCV antigen prepared as an expression product obtained by the genetic engineering method, or an HCV antigenic peptide as a synthetic peptide. A preferred HCV antigen used in the present invention is that corresponds to the NS3 region of the non-structural region on the HCV genome.

(Examples)

The present invention will be described below more specifically by way of Examples.

Example 1: Influence of addition of DTT on the sensitized blood cell

After washing an immobilized human red blood cell with a phosphate buffer (pH 7.4) three times, it was suspended in an acetic buffer of pH 5.7 at a concentration of 1% by volume, and to the resulting suspension was added a purified HCV antigen (core antigen, 33C antigen and C100 antigen) prepared by genetic engineering to a final concentration of 6 µg/ml. After the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 hour, it was washed with a phosphate buffer (pH 7.4) three times, then lyophilized in a phosphate buffer (pH 7.4) containing 7.5% saccharose to obtain an HCV sensitized red blood cell. The HCV sensitized red blood cell thus obtained was resuspended in a tris-HCl buffer containing 2 mM dithiothreitol (DTT) and in a tris-HCl buffer containing no DTT as a control in the concentration of 1% by volume, and sensitivities were compared. For the comparison of the sensitivities, sequential dilutions of HCV antibody positive human serum with an antibody negative serum was used as a sensitivity monitoring serum. Into each well of a microtiter plate, 25 µl of phosphate buffer (pH 7.4), 25 µl of the serum for sensitivity monitoring of each concentration, and further 25 µl of the sensitized blood cell were added, and the mixtures were stirred for 30 seconds and left to stand at room temperature for an hour. Then, the influence on the sensitized blood cell was evaluated visually.

Table 1

Dilution of serum for sensitivity monitoring	Sensitized blood cell suspension	
	Presence of DTT	Absence of CTT
Serum A		
x 1	+	+
x 2	+	+
x 4	+	+
x 8	+	-
x 16	-	-
x 32	-	-
x 64	-	-
Serum B		
x 1	+	+
x 2	+	+
x 4	+	+
x 8	+	-
x 16	-	-
x 32	-	-
x 64	-	-

(+: positive, -: negative)

From the result shown in Table 1, it was found that in the case where the sensitized blood cell was resuspended in a buffer containing DTT, the sensitivity was improved.

Example 2: Influence of addition of 2ME on the sensitized blood cell

The sensitized blood cell prepared in the same manner as in Example 1 was resuspended in a tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 40 mM of 2-mercaptoethanol at a concentration of 1% by volume, and for stability during

storage after suspension, a tris-HCl buffer containing no 2-ME was used as a control for comparison. After dissolving, it was stored at 2 to 8°C and the comparison of sensitivity of the sensitized blood cells was performed in the same manner as Example 1.

Table 2

Storage period at 2-8°C (day)	Sensitized blood cell suspension					
	Presence of 2-ME			Absence of 2-ME		
	0	7	14	0	7	14
Dilution of serum for sensitivity monitoring						
Serum A						
x 1	+	+	+	+	+	+
x 2	+	+	+	+	+	-
x 4	+	+	+	+	-	-
x 8	+	+	+	+	-	-
x 16	-	-	-	-	-	-
x 32	-	-	-	-	-	-
x 64	-	-	-	-	-	-
Serum B						
x 1	+	+	+	+	+	+
x 2	+	+	+	+	+	-
x 4	+	+	+	+	-	-
x 8	+	+	+	+	-	-
x 16	-	-	-	-	-	-
x 32	-	-	-	-	-	-
x 64	-	-	-	-	-	-

(+: positive, -: negative)

From the result shown in Table 2, it was confirmed that the stability of sensitized blood cell during storage

was improved by the addition of 2-ME.

Example 3: Influence of addition of glutathione on the sensitized blood cell

The sensitized blood cell prepared in the same manner as in Example 1 was lyophilized in a phosphate buffer containing 7.5% saccharose to which glutathione (GSH) was added to a final concentration of 40 mM to obtain a sensitized blood cell. The sensitized blood cell was lyophilized in a buffer containing no GSH to obtain a control sensitized blood cell. The sensitized blood cell and the control sensitized blood cell were suspended in a tris-HCl buffer (pH 7.8) at the concentration of 1% by volume respectively, and stability during storage after suspension at room temperature was compared with respect to the sensitivity. The comparison of sensitivity was performed in the same manner as Example 1.

Table 3

Storage period at room temp. (day)	Buffer for lyophilization					
	Presence of GSH			Absence of GSH		
	0	1	2	0	1	2
Dilution of serum for sensitivity monitoring						
Serum A						
x 1	+	+	+	+	+	+
x 2	+	+	+	+	+	-
x 4	+	+	+	+	-	-
x 8	+	+	+	+	-	-
x 16	-	-	-	-	-	-
x 32	-	-	-	-	-	-
x 64	-	-	-	-	-	-
Serum B						
x 1	+	+	+	+	+	-
x 2	+	+	+	+	+	-
x 4	+	+	+	+	-	-
x 8	+	+	+	+	-	-
x 16	-	-	-	-	-	-
x 32	-	-	-	-	-	-
x 64	-	-	-	-	-	-

(+: positive, -: negative)

From the results shown in Table 3, it was confirmed that the sensitized blood cell lyophilized with the addition of GSH was stable after suspension.

Example 4: Influence of addition of 2-ME addition on the immobilized antigen

Polystyrene beads of 1/4 inches were added to a phosphate buffer (pH 7.4) containing 7.5% succharose and

the HCV antigen used in Example 1 was added to a final concentration of 10 μ l/ml. The mixture was left to stand at 37°C for 1 hour, washed with a phosphate buffer (pH 7.4) three times, further dipped in a phosphate buffer (pH 7.4) containing 7.5% saccharose, and dried to obtain an HCV antigen immobilized bead. One of the HCV antigen immobilized beads was placed on a tray of wide well to which 200 μ l of tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 20 mM 2-ME was added as a reaction buffer. After the tray was left to stand at room temperature for 1 hour, 10 μ l of the serum for monitoring sensitivity was added thereto and the reaction was continued at 37°C for 1 hour. After the reaction was completed, the reaction mixture was washed with a physiological saline solution three times, and 200 μ l of peroxidase-labeled anti-human immunoglobulin was added to effect reaction at 37°C for 30 minutes. After completion of the reaction, the mixture was washed with a physiological saline solution three times, and then 1 ml of a substrate solution containing ortho-ethylenediamine and hydrogen peroxide was added thereto. After reaction was carried out at room temperature for 30 minutes, the mixture was determined by measuring absorbance at 490 nm. As a control, a tris-HCl buffer containing no 2-ME was used as a reaction buffer and the analogous procedures were repeated for evaluation.

Table 4

	<u>Buffer for measurement</u>			
	<u>Presence of 2-ME</u>		<u>Absence of 2-ME</u>	
	Absorbance	Evaluation	Absorbance	Evaluation
<u>Dilution of serum for sensitivity monitoring</u>				
<u>Serum A</u>				
x 1	1.82	+	0.69	+
x 2	1.44	+	0.45	-
x 4	0.96	+	0.32	-
x 8	0.56	+	0.26	-
<u>Serum B</u>				
x 1	1.29	+	1.31	+
x 2	0.93	+	0.73	+
x 4	0.59	+	0.47	-
x 8	0.38	-	0.30	-
x 16	0.25	-	0.26	-

(+: positive, -: negative)

From the results shown in Table 4, it was observed that the sensitivity was improved by the addition of 2-ME to the reaction buffer.

Example 5: Influence brought about by the addition of 2-ME

The HCV antigen-sensitized blood cell prepared in the same manner as in Example 1 was suspended in a tris-HCl buffer (pH 7.8). After the resulting suspension was left to stand at 2 to 8°C for 2 weeks, the sensitivity of the sensitized blood cell was measured against three specimens containing anti-core (core region of HCV), anti-33C (NS3

region of HCV) and anti-C100 (NS3-NS4 region of HCV) antibodies, respectively as the anti-HCV antibody positive specimen, and was discussed in the same manner as in Example 1. To the suspension was added 40 mM of 2-ME, and the sensitivity was measured in the same manner.

Table 5

	Sensitized blood cell in which 2-ME was added to the suspension	Sensitized blood cell in which 2-ME was not added to the suspension
<hr/>		
Dilution of specimen		
Anti-C33 antibody		
x 128	+	+
x 256	+	+
x 512	+	-
x 1024	+	-
x 2048	+	-
x 4096	+	-
x 8192	-	-

(+: positive, -: negative)

From the result, the sensitivity, which was decreased after leaving to stand for 2 weeks, was observed to have been recovered by the addition of 2-ME with respect to 33C antigen encoded by NS3 region on the HCV genome.

(Effect of the Invention)

In a reagent containing an antigen having a sensitive thiol group or a peptide having substantially the same function as the antigen, the sensitivity of the reagent for immunologically measuring an antibody in a specimen can be

FROM TAPIC

2000年9月10日(月) 51/譜13:46/文書番号4802740439 P 21

improved by adding a reducing agent to the reagent or by treating the reagent immobilized onto a solid phase with a reducing agent. (1)